

UNTERSUCHUNG DER ANTIGENITÄT
VERSCHIEDENER ANTIGEN-
PRÄPARATIONEN VON ZWEI
PLASMODIUM FALCIPARUM STÄMMEN
IM ELISA (ENZYMGEBUNDENER IMMUN-
ABSORPTIONSTEST) UND VERGLEICH
DIESES TESTS MIT DEM IFAT (INDIREKTER
IMMUNFLUORESZENZTEST).

Folke Hess



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554631_0001

Aus dem Institut für Infektions- und Tropenmedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lang

UNTERSUCHUNG DER ANTIGENITÄT VERSCHIEDENER ANTIGEN-
PRÄPARATIONEN VON ZWEI PLASMODIUM FALCIPARUM STÄMMEN
IM ELISA (ENZYMGEBUNDENER IMMUNABSORPTIONSTEST) UND
VERGLEICH DIESER TESTS MIT DEM IFAT (INDIREKTER
IMMUNFLUORESCENZTEST) .

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Folke Hess

aus

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Lang

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn
Prof. Dr. med. A. Bauernfeind

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Th. Löscher

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1987

Herrn Prof. Dr. W. Lang möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danken.

Bei Herrn Dr. Löscher bedanke ich mich ganz besonders für die wissenschaftliche Anleitung und Hilfe bei der Ausarbeitung.

Herrn Dr. Heidrich, Martinsried, sei vielmals für die " zur Verfügungstellung " von Antigen gedankt.

Frau Meissner, ihren Kolleginnen und besonders Frl. Nägele danke ich recht herzlich für die technische Hilfe.

Ebenso den Mitarbeitern der parasitologischen und Veterinärmedizinischen Abteilung, besonders Frl. Wegert, die für mich einen großen Teil der Seren im IFAT testete.

Außerdem ,dem Institut für medizinische Statistik der technischen Universität München, und hier besonders Herrn Dr. Ulm für die statistische Beratung.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</u>	5
<u>3. MATERIAL UND METHODIK</u>	6
<u>3.1. Antigengewinnung</u>	6
3.1.1. Kulturmethode	6
3.1.2. Gemischtes Kulturantigen	7
3.1.3. Konzentriertes Schizontenantigen	8
3.1.4. Simultane Präparation von Merozoiten und Schizonten	9
3.1.5. FCB - Antigen I S95	11
3.1.6. Immunabsorption mit Affinitätschromatographie	12
Tabelle 1. Antigenübersicht	15
<u>3.2. Seren</u>	16
<u>3.3. Serologische Tests</u>	17
3.3.1. IFAT	17
3.3.2. ELISA	18
<u>3.4. Statistische Auswertung</u>	20
<u>4. ERGEBNISSE</u>	21
<u>4.1. Vergleich : ELISA gegen IFAT</u>	21

4.1.1. Sensitivität und Spezifität von ELISA und IFAT	22
4.1.2. Unterschiede zwischen ELISA und IFAT bezüglich Sensitivität und Spezifität	25
4.1.3. Titer im ELISA und IFAT in Abhängigkeit von der Dauer der Erkrankung	27
4.1.4. Titer im ELISA und IFAT in Abhängigkeit von der Parasitämie im Blutausstrich der Patienten	29
4.1.5. Beziehung der Größen : "Titer - Parasitämie - Erkan- kungsdauer " zueinander	30
4.2. Vergleich verschiedener Antigene im ELISA	31

4.2.1. Sensitivität und Spezifität des ELISA bei 13 ver- schiedenem Antigenen	31
4.2.2. Vergleich der beiden Stämme FCB und FMCMc1 bezüg- lich ihrer Reagibilität im ELISA	33
4.2.3. Vergleich verschieden-konzentrierter Schizonten- antigene	34
4.2.4. Vergleich von Antigenen aus verschiedenen Stadien ...	36
4.2.5. Antigen, gewonnen durch Immunabsorption	37
4.3. Kreuzreaktionen im ELISA zwischen Malaria tropica und ----- verschiedenen anderen Infektionskrankheiten	38

5. DISKUSSION	40

5.1. Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen	40

5.1.1. Antigen	40
5.1.2. Seren	42
5.1.3. Testverfahren	42

5.2. Vergleich mit anderen Untersuchungen und Bewertung

eigener Ergebnisse 44

5.3. Schlußfolgerungen 52

6. ZUSAMMENFASSUNG 547. ANHANG

LITERATURVERZEICHNIS 55

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Die Bekämpfung oder gar Ausrottung parasitärer Krankheiten ist aus verschiedenen Gründen schwierig. Viele Parasiten haben sich im Laufe ihrer Entwicklungsgeschichte nahezu vollständig an den menschlichen oder tierischen Wirtsorganismus angepasst. Es werden zwar Antikörper produziert, die Parasiten haben jedoch verschiedene Mechanismen entwickelt, um der spezifischen und unspezifischen immunologischen Abwehr zu entgehen. (15)

Immunität gegen Malaria entwickelt sich bei dauernder Exposition in holo- oder hyperendemischen Gebieten. Sie kann jedoch nach Verlassen dieser Gebiete relativ schnell, innerhalb von Monaten bis wenigen Jahren, wieder abklingen, da sie von dauernder Antigenstimulation abhängt. Bei chronischen Infektionen mit *Plasmodium malariae* kann sich sogar ein Gleichgewicht zwischen Wirt und Parasit einstellen, das als Prä-munität bezeichnet wird. (15) Diese kontrolliert im allgemeinen die Infektion, beherrscht sie aber nicht völlig, so daß sie über lange Zeit persistieren kann (3).

Natürlich erworbene Immunität ist hauptsächlich gegen den ungeschlechtlichen Parasitenzyklus im Blut gerichtet und spezies- sowie stadienspezifisch. Auch Metabolite, nicht mehr intakte Parasiten und deren Bruchstücke, sowie Membranen befallener Erythrozyten können als plasmodienassoziierte Antigene erkannt werden (2).

Eine wichtige Rolle dabei spielen Antikörper, die von B- Lymphozyten gebildet werden. Malariainfektionen stellen einen potenten Stimulus für die Synthese von Immunglobulinen dar (1). Diese scheinen in erster Linie für eine Immunität verantwortlich zu sein, was durch Übertragung

von B- Lymphozyten von immunen auf empfängliche Ratten bei Plasmodium berghei gezeigt werden konnte (8).

Diese humoralen Antikörper können mit einer Reihe serologischer Tests nachgewiesen werden;

zwar kann keiner dieser Tests den funktionellen Immunstatus vollständig reflektieren,dennoch konnten schützende Antikörper,besonders der Klassen IgG und IgM, nachgewiesen werden (22).

Da jedoch Antikörper in meßbarer Konzentration erst etwa 5 - 7 Tage (19) nach Krankheitsausbruch einer Malaria gebildet werden,erfordert die Diagnose einer akuten Malaria immer den direkten Parasitennachweis. So ist die Serologie bei akuter Malaria von geringem Wert.Trotzdem kann eine serologische Untersuchung in verschiedenen Fällen indiziert sein:

1. Bei Patienten,bei denen der direkte Parasitennachweis aufgrund zu geringer Parasitämien auch im dicken Tropfen nicht möglich ist,z.B.
 - bei protrahierten Verläufen
 - bei unbehandelter Malaria
 - bei chronischen Malariaformen (TSS,Quartana,chron.GN)
2. Zur Differentialdiagnose
 - bei Symptomen wie Hepatosplenomegalie,Fieber,Anämie,nephrotischem Syndrom,gastrointestinalen Beschwerden und vielen anderen,bei gleichzeitig negativem Parasitennachweis
 - bei verschiedenen Malariaformen
3. Zu epidemiologischen Zwecken,wie
 - Feststellung der Durchseuchung in Endemiegebieten
 - Malariakontrollprogrammen und Beurteilung von Bekämpfungsmaßnahmen

- Identifizierung von Malariaherden
- Aufdeckung von Malaria bei Blutspendern, um die Möglichkeit von Transfusionsmalaria auszuschließen.

4. retrospektiv

- z.B. aus gutachterlichen Gründen
- um die Natur fieberhafter Erkrankungen in der Anamnese abzuklären.

Besonders der indirekte Immunfluoreszenztest (IFAT) fand bisher weit verbreitete Anwendung.

Verdünnungen von Testseren reagieren mit ausgestrichenem Antigen. Als Antigenquelle kommt Blut von akut Erkrankten oder Blut aus in-vitro Kulturen (nur bei *Pl.falciparum* möglich) in Frage.

Nichtreagierende Komponenten werden gewaschen und es wird fluoreszinmarkiertes Antiglobulin zugegeben. Nach nochmaligem Waschen wird die Intensität der Fluoreszenz, die der Antikörperreaktionsstärke entspricht, beurteilt.

Der IFAT ist gut für Feldstudien geeignet.

Nachteil ist allerdings die subjektive Beurteilung durch das visuelle Ablesen der Ergebnisse im Fluoreszenzmikroskop, was erfahrenes Personal erfordert.

Zudem ist der Antigenverbrauch relativ groß und es sind möglichst hohe Parasitämien im Antigenmaterial nötig. Die Möglichkeit der Kultivierung läßt dieses Problem in den Hintergrund treten.

Wichtiger ist, daß durch die Ausstrichtechnik bedingt, das Antigen beim IFAT stark verunreinigt ist mit Erythrozytenmembranen, sowie anderen potentiell antigenetisch wirksamen Bestandteilen des Blutes.

Außerdem wird im IFAT hauptsächlich Oberflächenantigen präsentiert, wodurch nur ein Teil des Antigenspektrums abgedeckt wird.

Es wurden auch Kreuzreaktionen verschiedener Plasmodienarten untereinander, sowie zwischen Plasmodien und Babesien beim IFAT beschrieben.

Andere Tests, die als akzeptabel für Malaria angesehen werden, sind der indirekte Hämagglutinationstest, die Agar Gel Diffusion und der Enzymgebundene Immunabsorptionstest (ELISA).

Letzterer gewinnt auch bei Malaria immer mehr an Bedeutung.

Das Prinzip dieses Tests ist analog dem des IFAT, mit dem Unterschied, daß ein Enzym anstelle von Fluoreszin zur Markierung des Antiglobulins verwendet wird. Eine photometrische Auswertung der Enzymkonzentration mittels eines chromogenen Substrates ersetzt die visuelle Schätzung der Fluoreszenzintensität beim IFAT; die Auswertung kann jedoch auch mit dem bloßen Auge vorgenommen werden.

Neben diesem Vorteil hat der ELISA einen sehr geringen Antigenverbrauch und es können relativ schnell eine größere Anzahl an Patientenseren getestet werden. Daher bietet sich der ELISA für Feldstudien besonders an.

Im ELISA wird kein korpuskuläres Antigen wie im IFAT verwendet, sondern lösliches. Die Kontamination mit Fremdanigen (d.h. unspezifischen Komponenten) dürfte, je nach Herstellungsmethode des löslichen Antigens, geringer sein, als die des IFAT. Jedoch auch beim ELISA wurden Kreuzreaktionen zwischen einigen Plasmodienarten beobachtet.

2. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Herstellung eines löslichen Antigens ist ein vorrangiges Problem beim ELISA.

Antigene sollten zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen möglichst frei von Wirtszellbestandteilen sein. Vor allem diese wirtszellfreie Isolierung von Parasiten aus den befallenen Erythrozyten, bei der Gewinnung von Plasmodienantigenen, ist mit Schwierigkeiten verbunden. Hier werden auch Grenzen gesehen für die Reproduzierbarkeit der Herstellung eines standardisierten Antigens (30).

Erst mit gereinigtem Antigen läßt sich ein Standard herstellen, sowie eine spezifischere serologische Antwort erhalten. Andernfalls müssen immer auch unspezifische Reaktionen berücksichtigt werden.

Der Einfluß verschiedener antigenbezogener Parameter auf die serologischen Reaktionen ist zudem noch nicht genauer untersucht worden.

Daher sollten in dieser Arbeit verschiedene Antigenisolierungstechniken auf ihre Eignung für den ELISA geprüft werden. Dabei sollte einerseits der Einfluß von Stamm, Parasitenstadium und Parasitämie des zur Antigengewinnung verwendeten Materials untersucht werden, andererseits der Einfluß auch patientenbezogener Daten, wie Dauer der Erkrankung und Parasitämie im peripheren Blut des Patienten.

Außerdem sollten die Ergebnisse des ELISA mit denen des IFAT verglichen werden, bezüglich Sensitivität, Spezifität und Abhängigkeit von genannten Faktoren. Dabei sollte auch auf Kreuzreaktionen mit heterologen Plasmodienantikörpern, als auch mit Antikörpern gegen andere Krankheitserreger (nur ELISA) geachtet werden.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Antigengewinnung

3.1.1. Kulturmethode

Als Ausgangsmaterial dienten zwei *Plasmodium falciparum* Stämme, die in 100 mm x 100 mm Petrischalen nach der von Trager und Jensen beschriebenen Methode (27) kultiviert wurden.

Jede Platte enthielt eine ca. 5 % -ige Erythrozytensuspension in 15 - 20 ml RPMI 1640 Medium + 10 % Humanserum AB⁺. Für jeden Kulturansatz wurden Erythrozyten gleicher Blutgruppe verwandt.

Die Schalen wurden in einen Exsiccator gestellt, eine Stearinkerze wurde im Exsiccator angezündet und der gefettete Exsiccatordeckel bei geöffnetem Hahn aufgesetzt. Nach Erlöschen der Flamme wurde der Hahn geschlossen. Zur Erhaltung einer sauerstoffarmen Atmosphäre wurde zusätzlich aus einer Prüfgasflasche ein Gasgemisch von 90 % N₂ : 5 % O₂ : 5 % CO₂ zugeleitet, um die Kultur vor einem Anstieg der Sauerstoffspannung durch eventuelle Undichtigkeiten des Systems zu schützen.

Die Kulturen wurden bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

Es kam somit eine 75 - 100 µm tiefe Schicht Erythrozyten auf dem Boden der Petrischalen zu liegen, die von einer ca. 1,5 - 2 mm tiefen Schicht Medium bedeckt wurde.

Das Medium wurde durch Abpipettieren des Überstandes und erneuter Zugabe von ca. 15 - 20 ml frischem Medium 1x täglich gewechselt.

Die Kulturen wurden durch Subkultivieren entsprechend dem Parasitenwachstum alle 2 - 3 Tage mit frischen Erythrozyten verdünnt und auf einer Ausgangsparasitämie von 0,1 - 1 % eingestellt. Überschüssiges Material wurde

in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Der Stamm FCB wurde von Dr. Heidrich, Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried, zur Verfügung gestellt, der Stamm FMCMc1 wurde von einem Patienten der Abteilung des Tropeninstitutes 1982 isoliert.

3.1.2. Gemischtes Antigen

Zur Gewinnung von gemischtem Kulturantigen wurden die Kulturen FCB und FMCMc1 mit Parasitämien von 2 bzw. 3 %, also relativ niedrig, verwandt. Solche Parasitenkonzentrationen sind auch häufig im Blut Erkrankter anzutreffen.

Die Isolierung der Plasmodien aus dem Kulturmaterial erfolgte durch Ammoniumchloridhämolyse:

1. Es wurde eine 50 % - ige Erythrozytensuspension in Medium hergestellt.
2. 0,83 % - ige Ammoniumchloridlösung wurde mit 0,17 M Trispuffer auf einen pH von 7,4 eingestellt.
3. Die Erythrozytensuspension und die Ammoniumchloridlösung wurden im Verhältnis 1 : 10 gemischt.
4. Es wurde 3 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert.
5. Mit 500 g wurde 12 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.
6. Das Sediment wurde zweimal in PBS bei 500 g je 5 Minuten gewaschen.
7. Danach wurde das Sediment in wenig PBS bis auf ein Endvolumen von ca. 5 ml gelöst und 2-3x bei 4° C je 10 Sekunden mit einer Ausgangsleistung von 50 Watt beschallt. (Ultraschallgerät: Marke Sonifier^R B- 12; Branson sonic Power Company)
8. Diese Suspension wurde 20 Minuten bei 4° C mit 20000 U/min zentrifugiert (Ultrazentrifuge Typ Sorvall R-C-28 Rotor SS 34)
9. Der Überstand wurde verworfen

10. Das Sediment wurde nochmal in PBS gelöst (Endvolumen : 5 ml)
11. Diese Lösung wurde 8 x je 10 Sekunden bei 4° C und 50 Watt beschallt. Nach jedem Beschallungsvorgang wurde eine Pause von ca. 30 Sekunden eingelegt, um eine Denaturierung von Proteinen durch die ,trotz Kühlung, entstehende Wärme, möglichst auszuschließen.
12. Danach wurde im SS 34 unter genannten Bedingungen zentrifugiert.
13. Der Überstand wurde nach Bestimmung des Proteingehalts (Bio Rad Assay nach Bradford) als gebrauchsfertiges Antigen in 0,5 ml Portionen abgefüllt und bei - 20° C eingefroren.

Es entstanden auf diese Art die Antigenpräparationen I K2 und II K3 *

3.1.3. Konzentriertes Schizontenantigen

Für die Antigene I S14, I S40, II S12 und II S45 * (siehe auch Tabelle 1) wurde die Parasitenkonzentration im Ausgangsmaterial durch Gelatinesedimentation erhöht (11) :

1. Es wurde eine 25 % ige Erythrozytensuspension in Medium hergestellt
2. Diese Suspension wurde mit Physiogel im Verhältnis 1 : 1 gemischt
3. Es wurde 30 min bei 37° C inkubiert.

Im Überstand reicherten sich vermehrt Erythrozyten an, die reife Formen von Parasiten, d.h. Schizonten und reifere Trophozoiten enthielten. Wiederholung der Gelatinesedimentation mit dem Überstand (bei I S40 und II S45) ergab eine weitere Steigerung der Parasitenkonzentration, d.h. des Verhältnisses parasitierter zu nicht parasitierten Erythrozyten. Zudem wurde so der Anteil an Erythrozyten

* : Diese Kurzbezeichnung beinhaltet Informationen über den Stamm (FCB = I, FMCMc1 = II), das vorherrschende Parasitenstadium (K = gemischt, S = Schizont, M = Merozoit) und die Ausgangsparasitenkonzentration vor der Hämolysen.

mit jüngeren Stadien noch stärker reduziert, so daß jetzt Ringformen so gut wie nicht mehr anzutreffen waren, und auch die Trophozoiten nur noch vereinzelt vorkamen.

Zur Herstellung von löslichem Antigen aus diesem Material, wurde wie bei gemischtem Antigen, Arbeitsschritten 1. - 13. gemäß, verfahren.

3.1.4. Simultane Präparation von Merozoiten und Schizonten

Dabei wurde nach der von Tharavanij (25) beschriebenen Methode vorgegangen:

1. Die Kultursuspension wurde mit 650 g max. bei 4° C, 7 Minuten zentrifugiert.
2. Der merozoitenhaltige Überstand wurde abgehoben und bei 6800 g max. und 4° C, 8 Minuten zentrifugiert.
3. Die sedimentierten Merozoiten wurden 2 x in PBS gewaschen und anschließend beschallt : 7 - 8 x je 10 Sekunden mit 50 Watt bei 4° C .
4. Diese Suspension wurde nochmals zentrifugiert bei 10000 g max. und 4° C über 20 Minuten. Der Überstand wurde als lösliches Antigen in 0,5 ml Portionen abgefüllt, nach Bestimmung des Proteingehalts, bei - 70° C tiefgefroren.
5. Das Sediment aus Schritt 1. wurde in RPMI 1640 mit 10 % - igem Serumzusatz resuspendiert bis zu einem Hämatokrit von ca. 25 %.
6. Danach wurde eine Gelatinesedimentation durchgeführt.
7. Der Überstand der Gelatinesedimentation wurde bei 650 g max. 4° C, 7 Minuten zentrifugiert.

8. Das dabei abgesetzte Sediment wurde wieder in kompletten Medium (= mit Serumzusatz) RPMI 1640 resuspendiert (ca. 2 ml Medium auf ca. 0,1 ml Sediment) und diese Suspension wurde auf 4 ml 50 % - igen Perkolls (Pa. Pharmacia) in 0,25 M Sacharoselösung, gegeben.
9. Es wurde nochmals in der Ultrazentrifuge bei 10000 g max. über 20 Minuten bei 4° C zentrifugiert.
10. In dem sich einstellenden kontinuierlichen Dichtegradienten bildete sich eine Fraktion von, mit reifen Schizonten parasitierten Erythrozyten, die vorsichtig abgezogen wurde.
11. Diese Erythrozyten wurden 2x in PBS bei 650 g max. , 4° C je 10 Minuten gewaschen. Zwischen ca. 60 und 80 % der Erythrozyten enthielten Parasiten, zum überwiegenden Teil reife Schizonten. Diese hohen Konzentrationen konnten nur erreicht werden durch das "Hintereinanderschalten" der zwei Konzentrationsverfahren, Gelatinesedimentation und Percoll - Dichtegradient.
12. Die Erythrozyten wurden in PBS resuspendiert und nach der Proteinbestimmung ebenfalls bei - 70° C gelagert. Um die Erythrozyten vor einer Hämolyse nach dem Auftauen zu schützen, wurde ein Gefrierschutzmittel nach Trager und Jensen (27) zugegeben: 70 ml Glycerin + 180 ml einer 4,2 % - igen Mannitlösung in 0,9 % - igem NaCl.
Davon wurde zur Erythrozytensuspension im Volumenverhältnis 1 : 1 zugegeben.
13. Zum Gebrauch wurde die aufgetaute Suspension weiterbehandelt wie gemischtes Antigen 1. - 13. (siehe 3.1.2.)

Es wurden auf diese Weise die Antigene I S60 und I M, sowie II S75 und II M , gewonnen.

3.1.5. FCB - Antigen I S95 ; Max Planck Institut

Zusätzlich zu den selbst hergestellten Antigenen, wurde ein Antigen mitgetestet, das vom Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried hergestellt worden war.

Aufgrund seiner hohen Konzentration und Reinheit kann es als Kontrollantigen aufgefasst werden.

Es wurde aus einer synchronisierten Kultur mit einer Ausgangsparasitämie von ca. 10 % gewonnen. Die Anreicherung erfolgte in einem Perkolldichtegradienten auf ca. 95 %; reife Schizonten (Angabe : Dr. Heidrich) hauptsächlich. Die Isolierung von den Erythrozyten erfolgte mechanisch. Dazu passierten die Erythrozyten hintereinandergeschaltete Mikrofilter abnehmender Porengröße, während sie dabei mechanisch zerstört und die Plasmodien freigesetzt wurden. Der Grad der Kontamination mit Erythrozytenbruchstücken wäre außerordentlich gering gewesen (9).

Lösliches Antigen wurde wie bei gemischtem Antigen beschrieben, gewonnen (3.1.2.: Arbeitsschritt 10. - 13.)

3.1.6. Immunabsorption mit Affinitätschromatographie

Zur Isolierung von Plasmodien mittels Immunabsorption wurde CNBr-aktivierte Sepharose 6 MB verwandt. Im wesentlichen wurde dabei nach den Vorschriften des Herstellers Pharmacia Fine Chemicals verfahren:

1. Aus einem Pool von ca. 30 , im IFAT hochtitrigen (Minimum: 1:128) Antimalariaseren, wurde durch Caprylsäurefällung Immunglobulin G isoliert (21).

Vorgehen:

- 3ml des Serungemisches wurden mit 8 ml Azetatpuffer (0,06 M, pH 4) versetzt und mit 0,1 M NaOH auf einen pH von 4,8 eingestellt.
- Tropfenweise wurde unter kräftigem Rühren 0,27 g Caprylsäure (1 ml = 0,9 g) zugegeben.
- Es wurde 30 Minuten rotiert, anschließend mild zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgesaugt.
- Das Präzipitat wurde in 8 ml 0,015 M Azetatpuffer (pH 4,8) resuspendiert, nochmals zentrifugiert und der Überstand zu obigem zugegeben.

Der Proteingehalt dieser Lösung betrug 7,44 mg/ml. Die Lösung wurde lyophilisiert und bei - 20° C gelagert.

- Zum Gebrauch wurde das lyophilisierte Material in Aqua dest. gelöst und mit einer PD 50 Membran gegen H₂O dest dialysiert. Der Proteingehalt des Dialysats betrug 5,32 mg/ml. Dieser Proteingehalt wurde durch nochmaliges Lyophilisieren eingeeengt: Dabei wurde das Dialysat, insgesamt 7 ml , in 3 Portionen zu je 10 mg (Gebrauchsmenge) und einen Rest von 5,32 mg, geteilt.

2. Dieses IgG wurde nun an die Sepharose gekoppelt.

- Im Glasfilter (Porengröße 15 μm) wurde die Sepharose zunächst 15 Minuten mit 1 mM HCL gewaschen. 1 g Sepharose quoll dabei auf ca. 3 ml Gelvolumen.
- Das lyophilisierte IgG wurde in Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO_3 -Puffer + 0,5 M NaCL) 2 Stunden bei Zimmertemperatur und danach über nacht bei 4° C gelöst und End über End rotiert. Für 1 g Sepharose wurden 10 mg IgG benötigt.
- Ungebundenes Material wurde anschließend mit Kopplungspuffer gewegewaschen, eventuell noch verbliebene aktive Gruppen wurden mit 1 M Äthanolamin pH 8 ,Einwirkzeit: 2 Stunden, blockiert.
- 3 Waschzyklen mit jeweils 0,1 M Azetatpuffer + 0,5 M NaCL, pH 4 im Wechsel mit 0,1 M Boratpuffer, pH 8, + 0,5M NaCL wurden abgeschlossen, um nichtkovalent gebundenes Protein und blockierendes Reagenz abzuwaschen.
- Die nun gebrauchsfertige Sepharosesäule wurde mit PBS gespült und zur besseren Haltbarkeit in PBS + 0,05 % igem NaN_3 bei 4° C aufbewahrt.

3. Die Absorption der Plasmodien geschah folgendermaßen:

- Die IgG - beschichtete Säule wurde mit hämolysiertem Kulturmateri al, das vorher durch einfache Gelsedimentation schon angereichert war, versetzt, und 15 Minuten End über End rotiert. Dabei sollte die Bindung freigesetzter Plasmodienbestandteile an das spezifische IgG stattfinden.
- Um die Parasiten aus dieser Bindung wieder zu lösen, wurde nach einem Waschvorgang mit PBS die Säule mit löslichem gemischtem Antigen versetzt. (I K2, bzw. II K3)

- Die Säule wurde 30 Minuten bei 37° C inkubiert, um einen Austausch des korpuskulären gegen lösliches Antigen an den Bindungsstellen zu ermöglichen. Nach 15 Minuten wurde einige Male schnell rotiert.
- Das Antigen wurde dann mit PBS eluiert.
- Das Eluat wurde 30 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert; anschließend wurde das Sediment 2 x in PBS gewaschen.
- Lösliches Antigen wurde hergestellt nach : 3.1.2. Nr.10.- 13.

Auf diese Weise wurden die Antigene I S18 und II S20 gewonnen.

Zum Auswaschen der Säulen mit löslichem Antigen im Überschuß, wurde das bereits hergestellte gemischte Antigen des jeweiligen Stammes, verwandt, d.h. I K2 bzw. II K3 .

Tabelle 1. Antigenübersicht.

Stamm	Ausgangs- parasitä- mie in %	Konzen- trations- optimum in ug	Prote- inge- halt in mg/ml	Antigenart	Kurzbe- zeich- nung
FCB	2	5	2,25	gemischtes Kul- turmateri al	I K2
FMCMc1	3	10	1,58	gemischtes Kul- turmateri al	II K3
FCB	14	40	5,5	Schizonten	I S14
FMCMc1	12	40	3,5	Schizonten	II S12
FCB	40	40	1,96	Schizonten	I S40
FMCMc1	45	20	2,35	Schizonten	II S45
FCB ^x	60	10	3,14	Schizonten	I S60
FMCMc1 ^x	75	20	4,71	Schizonten	II S75
FCB ^{xx}	18	10	2,12	Schizonten	I S18
FMCMc1 ^{xx}	20	10	2,2	Schizonten	II S20
FCB	95	2,5	1,0	Schizonten	I S95
FCB	-	5	0,9	Merozoiten	I M
FMCMc1	-	2,5	1,06	Merozoiten	II M

x: Durch Perkoll - Dichtegradienten hergestellt

xx: Durch Immunabsorption gewonnen

Die Ausgangsparasitämie war die Konzentration, parasitierter Erythrozyten in Relation zur Gesamterythrozytenmenge, vor der Hämolyse.

Die Konzentrationsoptima wurden durch " Checkerboard Titration " erhalten.

Die Antigenart bezeichnet dasjenige Parasitenstadium, das in der jeweiligen Präparation vorherrschte.

Die Kurzbezeichnung beinhaltet Informationen über den Stamm (FCB = I, FMCMc1 = II), das vorherrschende Parasitenstadium (K - S - M) und die Ausgangsparasitämie.

3.2. Seren

Es wurden insgesamt 175 Seren aus der Serumbank des Tropeninstituts getestet. Die meisten davon stammten aus den Jahren 1982 - 1985. Vereinzelt waren auch ältere Serumproben darunter. Alle Seren waren tiefgefroren bei -20°C gelagert.

Die Seren setzten sich folgenderweise zusammen:

- 52 Seren von Patienten mit parasitologisch nachgewiesener Malaria tropica. 5 davon waren Doppelinfektionen von Plasmodium falciparum mit Plasmodium malariae (2x) oder Plasmodium vivax (3x).
- 30 Seren von Patienten, bei denen nur serologisch, durch den IFAT, die Diagnose Malaria gestellt worden war. Hierbei handelte es sich um eingesandte Seren von anderen Krankenhäusern. Der sichere parasitologische Nachweis blieb in diesen Fällen aus.
- 21 Patienten mit parasitologisch nachgewiesener Malaria tertiana oder quartana (14 x Pl. vivax, 3 x Pl. ovale, 3 x Pl. malariae, 1 x Pl. vivax + malariae)
- 61 Seren von Patienten mit nicht-Malaria-Infektionen. Davon waren 16 mit Amöbenruhr, 15 mit Leishmaniosen, 5 mit Toxoplasmose, 8 mit Lues, 5 mit Typhus, 6 mit Schlafkrankheit (serol. positiv) und 6 mit Salmonelleninfektionen (nicht Salmonella typhi).
- 11 Seren von gesunden Probanden, die nie in den Tropen und einem Malariaendemiegebiet waren. Von diesen Seren wurde in jedem Test eines als negative Kontrolle mitgeführt.

Alle Seren konnten ohne Einfluß auf die Titerhöhen einmal aufgetaut und wiedereingefroren werden, bei öfterem Wiedereinfrieren nahmen die Titerhöhen jedoch deutlich ab.

3.3. Serologische Tests

3.3.1. IFAT

Für den IFAT wurde Antigen in korpuskulärer Form benötigt. Das Kulturmaterial wurde ohne Schizontenanreicherung bei 2400 U/min (= 500 g) zweimal je 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand jedesmal abgesaugt und das Sediment als Antigen mit PBS, pH 7,2 , 20 % - ig eingestellt.

Die Suspension wurde als dünner Film auf gefelderte Objektträger (Fa. Hölzel) aufgetragen. Die so beschichteten Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet, zusammen mit Kieselgel in Plastikfolie verschweißt und bei - 40° C gelagert. Zur Verwendung wurden sie in Anwesenheit von Feuchtigkeitsschutz bei Raumtemperatur wieder erwärmt.

Der Test wurde folgendermaßen durchgeführt:

Von den Patientenserum wurden in Mikrotiterplatten mit Phosphatpuffer 6 Verdünnungsstufen von 1 : 16 bis 1 : 512 hergestellt.

Je 10 ul der Verdünnungen wurden auf die Objektträger gegeben.

In einer feuchten Kammer wurde 45 Minuten lang bei 37° C inkubiert, anschließend mit Leitungswasser abgespült und dreimal je 5 Minuten in PBS, pH 7,2 gewaschen. Nach dem Trocknen wurden 10 ul des fluorescein-konjugierten Antiglobulins IgG (Fa. Pasteur) vom Schaf (50 ul IgG in 1 ml PBS + 50 ul Evans Blue) auf jedes Antigenfeld gebracht. Es wurde wieder inkubiert, abgespült und mit PBS gewaschen. Zusätzlich wurde noch zweimal je 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen.

Nach dem Trocknen konnten die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz, Filterkombination 2/3) beurteilt werden. Eine intensive gelbgrüne Färbung zeigte eine positive Reaktion an, während eine Rotfär-

bung ein negatives Resultat angab. Die letzte Verdünnungsstufe mit eindeutiger Fluoreszenz wurde als Endtiter angegeben.

Titerstufen bis zu 1 : 32 wurden als negativ, ab 1 : 64 als positiv gewertet. Titer über 1 : 512 wurden ausstitriert.

3.3.2. ELISA

Der Test wurde modifiziert nach Engvall durchgeführt (5).

Polystyrolplatten mit Flachboden (Mikro - ELISA^R, Fa. Nunc) wurden 3 Stunden im Wasserbad bei 37° C mit der Antigenlösung sensibilisiert (Konzentration je nach Konzentrationsoptimum zwischen 2,5 und 40 µg/ml entsprechend einer Antigenmenge von 0,25 - 2 µg / Kavität).

Als Verdünnungsmittel diente Carbonatpuffer pH 9,6 (1,59 g Na₂CO₃ + 2,93 g NaHCO₃ ad 1 l H₂O dest.).

Zur Kältebindung wurden die Platten über Nacht bei 4° C gelagert und zum Gebrauch mit NaCl - Tween 20 (0,1 % Tween) zweimal ausgewaschen, um ungebundenes Antigen zu entfernen; zur Vermeidung unspezifischer Anlagerung von Serumproteinen an die Kavitätenwände wurde 0,5 % - iges BSA-PBS , pH 7,2 (= Bovines Serumalbumin in PBS), versetzt mit 0,5 % Tween 20, vorgelegt.

Die Seren wurden 1 : 4 verdünnt einpipettiert. Mit einem Mikrodiluter wurden nun 8 Verdünnungsstufen bis 1 : 512 angelegt. Die Platten wurden zur Antigen - Antikörperreaktion bei 37° C auf einem Taumelgerät inkubiert und nach 1 Stunde dreimal je 5 Minuten gewaschen (Waschlösungen: NaCl - Tween 20; 0,1 % -- BSA - PBS 0,5 % -- NaCl - Tween 20; 0,1 %). Zum Nachweis gebundenen IgG's wurde Anti - Human IgG (H + L Fab) von der Ziege (Fa. Pasteur) in einer Verdünnung 1 : 1000 verwandt. Diese

Konjugatverdünnung, angelegt in 4 % - igem BSA - PBS , pH 7,2 , wurde in 50 µl Portionen pro Kavität zugegeben. Die Platte wurde wieder auf dem Taumler bei 37° C inkubiert. Danach wurde, wie beschrieben, dreimal gewaschen, um ungebundenes Konjugat zu entfernen.

Als Substrat für die, mit dem Antiglobulin gekoppelte Meerrettichperoxidase, diente 0,08 % - ige 5 - Amino 2 - Hydroxybenzoesäure, die mit 1 n NaOH auf pH 6 eingestellt und mit 0,05 % - igem H₂O₂ in Aqua dest. im Verhältnis 10 : 1 gemischt wurde.

Davon wurde in jede Vertiefung 100 µl gegeben.

Bei positiver Reaktion bewirkte die hydrolytische Spaltung des Substrats einen Farbumschlag nach braunviolett, dessen Extinktionswerte nach einer weiteren Stunde Inkubation unter Lichtabschluß und bei Raumtemperatur, photometrisch mit einem Titertek^R Multiskan Photometer bei 450 nm abgelesen werden konnten. Auf jeder Platte wurde ein negatives Kontrollserum mitgeführt.

Als positiv galten Titer ab 1 : 32 über der Kontrolle.

Als Extinktionsgrenzwert der niedrigsten Verdünnung, die noch als Titerstufe galt, wurde eine Extinktion von 0,200 festgelegt. Bei diesem Wert war ein Farbumschlag mit dem bloßen Auge gerade noch erkennbar.

3.4. Statistische Auswertung

Erläuterung wichtiger, in der Arbeit verwendeter Begriffe:

- Sensitivität: Anteil der Fälle, die als krank erkannt wurden, von der Gesamtzahl Kranker (= richtig Positive).
- Spezifität : Anteil der Fälle, die als gesund erkannt wurden, von der Gesamtzahl Gesunder (= richtig Negative)
- Regressionsgeradengleichung: $Y = bX + a$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} ; a = \bar{y} - b \bar{x}$$

- Regressionskoeffizient: b = Maß für die Steigung der Geraden
- Korrelationskoeffizient: r

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

$0,8 < r \leq 1$	sehr hohe positive/negative (bei $r < 0$) Korrelation
$0,6 < r \leq 0,8$	hohe " " " Korrelation
$0,4 < r \leq 0,6$	mittelmäßige " " " Korrelation
$0,2 < r \leq 0,4$	geringe " " " Korrelation
$0 < r \leq 0,2$	keine " " " Korrelation

Erläuterungen der Tests und statistischen Methoden, die Verwendung fanden:

- χ^2 - Vierfeldertest (16) : $\chi^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$

- Vorzeichentest nach Mc Nemar (18): $\chi^2 = \frac{(b - c - 1)^2}{b + c}$ FG = 1

- Quadrantenkorrelation nach Blomqvist (18): Kritischer Punktwert bei 45 Probanden: unterer Wert: 7 auf dem 5 % Niveau bzw. 6 auf dem 1 % Niveau; oberer Wert: 15 bzw. 16, entsprechendes Niveau.
- Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (18) r_{SB} :

$$r_{SB} = 1 - \frac{6 \sum D^2}{(n^3 - n) - \left(\frac{1}{2} (t_x^3 - t_x) + \frac{1}{2} (t_y^3 - t_y)\right)}$$

- Q- Test nach Cochran (18):

$$z = \frac{\sum w_i D_i}{\sqrt{\sum w_i p_i (1 - p_i)}} ; \quad w_i = \frac{n_{i1} n_{i2}}{n_i} ; \quad D_i = \frac{a_i}{n_{i1}} - \frac{c_i}{n_{i2}} ;$$

$$p_i = \frac{a_i + c_i}{n_i} ;$$

- Multiple Vergleiche abhängiger Stichproben nach Wilcoxon und Wilcox (18) .

4. ERGEBNISSE

4.1. Vergleich: ELISA gegen IFAT

4.1.1. Sensitivität und Spezifität von ELISA und IFAT

Titer [⌘]	ELISA			
1/1024		X		
		XXXXXX		
1/256		XXXX	X	positiv
		XXXX	X	
1/64		XXXXXXXX		
	X	XXXX	XXX	
1/16	X	XXXXXX	XXXXX	negativ
	XX	XXXXXXXX	XXXXX	
1/4	XX	XXXXX	XXXX	
	XXXXX	XXXXXXXX	X	
	gesund	tropica	tert./quartana	
	Neg.Kontr.	Malaria		

Abb.1. ELISA und IFAT mit gemischtem Antigen (II K3) von Plas.falc.in vitro vom Stamm FMCMc1. Getestet wurden 11 Gesunde Probanden und 73 Malariapatienten. 52 von diesen hatten eine M.tropica, 21 eine M.tertiana oder quartana. (Parasitologisch nachgewiesen)

Titer [⌘]	IFAT			
1/1024		XXXXX	X	
		XXXXXXXX	X	positiv
1/256		XXXXXXXXXXXX	XXX	
		XXXXXXXXXX	XX	
1/64		XXXXX	XXXXXX	
		XXX		
1/16		XXXXX	XXX	negativ
		XX		
1/4	XXXX	XXXX	X	
	XXXXXXX	XX	XXX	
	gesund	tropica	tert./quartana	
	Neg.Kontr.	Malaria		

⌘ Titer bei Malariapatienten: Titerstufe der jeweiligen Negativ - Kontrolle wurde abgezogen.

Es wurden 73 Malariapatienten getestet. In 32 (50) Fällen war der ELISA (IFAT) mit II K3 - Antigen positiv. Dies entspricht einer Sensitivität für Malaria von 44 (68,5) %.

27 (36) dieser 32 (50) seropositiven Patienten hatten eine Malaria tropica, die übrigen 5 (14) eine Malaria tertiana oder quartana.

Da die parasitologische Untersuchung bei 52 Patienten eine Malaria tropica ergab, bedeuten die 27 (36) richtig positiv erkannten M. tropica Fälle eine Sensitivität für Malaria tropica von 52 (72) % im ELISA (IFAT).

Die parasitologische Untersuchung der übrigen 21 Malariapatienten ergab entweder Malaria tertiana oder quartana. Da 5 (14) von diesen im ELISA (IFAT) positiv bewertet wurden, allerdings mit relativ niedrigen Titerstufen, entspricht dies einer Spezifität für Malaria tertiana und quartana von 76 (33) % im ELISA (IFAT) mit Plas. falc. Antigen.

Bei den Gesunden gab es in einem (keinem) der 11 eine schwach positive Reaktion, was einer Spezifität für Nicht-Malaria von 91 (100) % im ELISA (IFAT) entspricht. Keiner der 11 gesunden Probanden war jemals in einem Malariaendemiegebiet.

Statistische Auswertung :

Da sich Sensitivität und Spezifität nur auf Personen desselben Merkmals beziehen, sind deren Aussagen bezüglich des gesamten getesteten Kollektivs nicht zu verwerten.

Um zu überprüfen mit welcher Sicherheit ein positives Resultat tatsächlich eine Malaria tropica oder eventuell nur eine tertiana, quartana oder gar keine Malaria ist, eignet sich der Vierfelder X^2 -Test.

Dabei ergab der Vergleich aller Resultate bei Malariapatienten, mit denjenigen der Gesunden, einen zwar nur auf dem 5 % Niveau gesicherten, aber dennoch statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der, im ELISA gestellten Diagnose: "seropositiv" und einer tatsächlichen Erkrankung an Malaria.

Beim IFAT war dieser Zusammenhang sogar hochsignifikant ($P \leq 1\%$). Auch bei der Sensitivität für Malaria tropica allein, also dem Vergleich nur der Malaria tropica Patienten mit Gesunden und Malaria tertiana und quartana Fällen, ergaben sich signifikante Niveaus. So war der Zusammenhang zwischen der Diagnose: "seropositiv" und der tatsächlichen Erkrankung an Malaria tropica beim ELISA hochsignifikant, beim IFAT, trotz der häufigen positiven Resultate bei tertiana und quartana Patienten, immerhin noch signifikant ($P \leq 5\%$).

Tabelle 3. Sensitivität von ELISA und IFAT mit Plasmodium falciparum Antigen aus in-vitro Kultur des Stammes FMCMc1.

	Sensitivität in %	
	für Malaria	für M. tropica
ELISA	44 *	52 **
IFAT	68,5 **	72 *

Für die Spezifität brachte der Vergleich der Gesunden, mit den an Malaria Erkrankten, signifikante Ergebnisse.

So war der Zusammenhang zwischen der Diagnose: "seronegativ" und dem Zustand gesund zu sein, beim ELISA signifikant gesichert, beim

* signifikant : $P \leq 5\%$

**hochsignifikant : $P < 1\%$

} gilt für alle Tabellen

IFAT sogar hochsignifikant.

Als Konsequenz ergab sich daraus, daß andere Spezifitäten, wie die Spezifität für nicht-tropica Malaria (= Malaria tertiana/quartana), nicht mehr signifikant sein konnten.

So ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Diagnose: " seronegativ " und einer Erkrankung an Malaria tertiana oder quartana nicht statistisch sichern. (siehe auch Tab. 4)

Tabelle 4. Spezifität von ELISA und IFAT mit Plasmodium falciparum Antigen aus in-vitro Kultur des Stammes FMCMc1.

	Spezifität in %	
	für Gesunde	für M. tertiana/ quartana
ELISA	91 *	76
IFAT	100 **	33

4.1.2. Unterschiede zwischen ELISA und IFAT bezüglich Sensitivität und Spezifität.

Zur Beurteilung dieser Unterschiede wurde der Vorzeichentest nach Mc Nemar angewendet (18).

Dabei wurden die absoluten Häufigkeiten Seropositiver und Seronegativer aus ELISA und IFAT in eine Vierfeldertafel eingetragen.

Im gesamten Kollektiv der 84 getesteten Patienten gab es in 67,8 % übereinstimmende Resultate (++) oder (--) in ELISA und IFAT. (siehe Tab. 5)

Tabelle 5. Gesamthäufigkeiten positiver und negativer Resultate in ELISA und IFAT bei 84 Probanden (73 Kranke, 11 Gesunde)

IFAT \ ELISA	+	-
+	28	22
-	5	29

Bei zweiseitiger Testung bedeutete dies noch einen hochsignifikanten Unterschied zwischen ELISA und IFAT, bezüglich des Gesamtresultats.

Werden die Patienten getrennt, in Gruppen mit jeweils gleichem Merkmal, ausgewertet, so ergibt sich Folgendes:

1. Malaria allgemein - IFAT hochsignifikant sensitiver als ELISA
(d.h. 52 M.tropica + 21 M.tert./quart. Patienten)

2. Malaria tropica - IFAT signifikant sensitiver als ELISA
(d.h. 52 Patienten)

3. Malaria tert./quart. - ELISA signifikant spezifischer als IFAT
(d.h. 21 Patienten)

4. Gesunde - ELISA und IFAT etwa gleich spezifisch
(d.h. 11 Probanden) χ^2 nicht berechnet wegen zu geringer Fallzahl.

4.1.3. Titer im ELISA und IFAT in Abhängigkeit von der Dauer der Erkrankung.

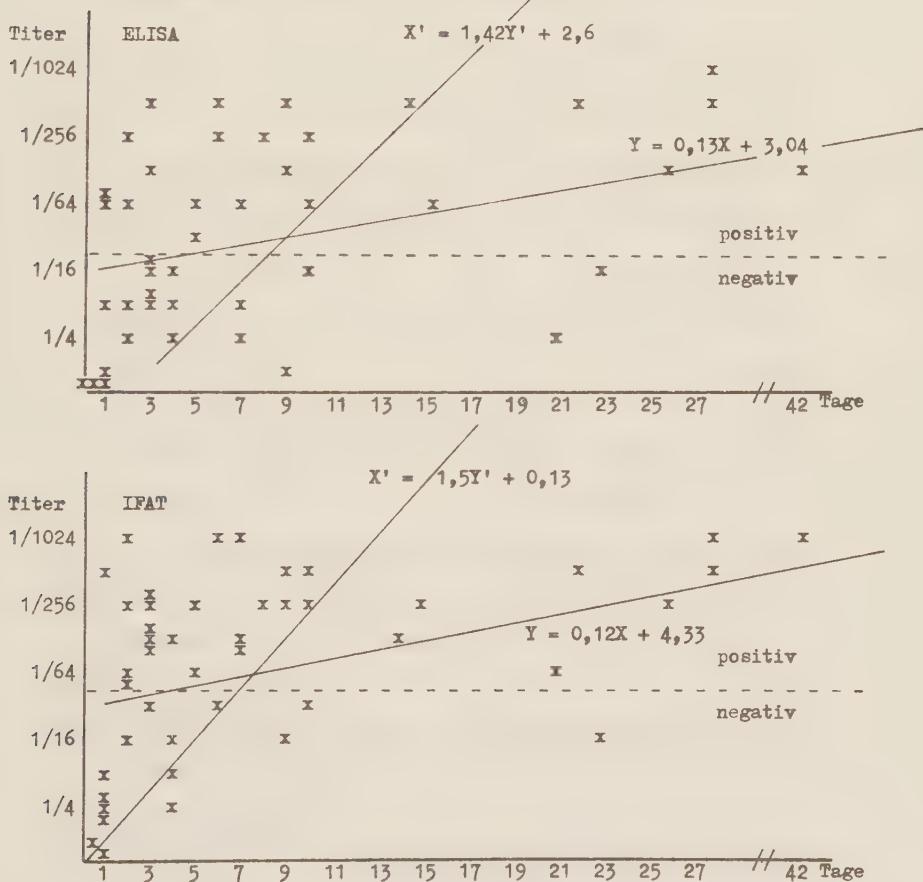


Abb.2. Titer von ELISA und IFAT mit gemischtem Antigen (II K3) vom Stamm FMCMe1, von 45 Patienten mit parasitologisch gesicherter Malaria tropica. Die Abszisse kennzeichnet das Intervall vom Symptombeginn bis zur Serumabnahme.

Jeweilige Regressionsgeraden Y bzw. X' eingezeichnet.

Schon der Schnelltest nach Blomqvist (18) zeigt eine Korrelation zwischen Titerstufenhöhe und Intervall von Beginn einer Symptomatik bis zur Serumabnahme und Diagnosestellung.

Danach bestand beim ELISA eine positive Korrelation, die auf dem 5 % Niveau statistisch jedoch nur schwach gesichert ist. ($P = 5 \%$) Der fast identische Verlauf der Regressionsgeraden des IFAT zu denen des ELISA, zeigt die gleiche schwach positive Korrelation beim IFAT.

Rechnerische Auswertung:

Der Korrelationskoeffizient gibt wieder, wie gut diese Korrelation wirklich ist.

ELISA: $r = 0,42$ (mittelmäßige positive Korrelation)

$$Y = 0,13X + 3,04$$

$$X' = 1,42Y' + 2,6$$

IFAT: $r = 0,43$ (mittelmäßige positive Korrelation)

$$Y = 0,12X + 4,33$$

$$X' = 1,5Y' + 0,13$$

Diese mittelmäßige positive Korrelation in beiden Tests besagt, daß die Zahl der Seropositiven in Relation zur Zahl der Seronegativen mit zunehmendem Intervall zwischen Beginn erster Symptome und dem Zeitpunkt der Serumabnahme, zugenommen hat.

So waren bei kürzer als 5 Tage bestehender Symptomatik nur 27 % der Patienten im Elisa, bzw. 50 % im IFAT positiv; dagegen waren bei Zurückliegen der ersten Symptome von mehr als 10 Tagen vor der Serumabnahme 78 % im ELISA und 89 % im IFAT positiv.

4.1.4. Titerstufen im ELISA und IFAT in Abhängigkeit von der Parasitämie im Blutausstrich des Patienten.

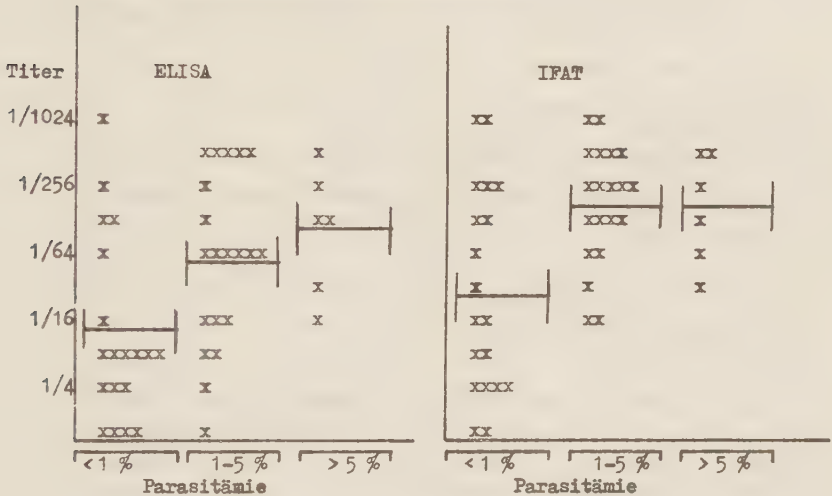


Abb.3. Titerstufen im ELISA und IFAT mit gemischtem Antigen (II K3) vom Stamm FMCMc1 ,bei 45 Patienten mit parasitologisch nachgewiesener Malaria tropica. Auf der Abszisse ist aufgetragen die Parasitämie im Ausstrich der Patienten, unterteilt in 3 Klassen : spärlich positiv (<1%); positiv (1-5%); hochpositiv (>5%);

Querbalken: Titermittelwerte jeder Parasitämie - Klasse .

Statistische Auswertung:

Da für die Parasitämie keine kontinuierliche, sondern eine Klasseneinteilung bestand, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman (18), "Rangkorrelationen mit Bindungen", berechnet.

ELISA : $r_{SB} = 0,433$ (mittelmäßige positive Korrelation)
 $z = 2,938$

IFAT : $r_{SB} = 0,393$ (geringe positive Korrelation)
 $z = 2,606$

Bei beiden Tests können die festgestellten Korrelationen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 1\%$ angenommen werden.

D.h. In beiden Tests nimmt der Anteil Seropositiver zu Seronegativen mit wachsender Parasitämie im Blut der Patienten zu.

Beim ELISA war diese Tendenz deutlicher als beim IFAT.

So waren bei schwacher Parasitämie 26 % im ELISA und 42 % im IFAT positiv; bei hoher Parasitämie waren es in beiden Tests über 80 %.

4.1.5. Beziehung der Größen: Titer - Parasitämie - Dauer der Erkrankung zueinander.

Für die statistische Auswertung kam hier der Q-Test von Cochran (18) zur Anwendung.

Es wurden folgende Werte berechnet:

ELISA: $z = 2,62$

IFAT: $z = 1,87$

Bei der vorliegenden Fragestellung, ob ein Zusammenhang der 3 Größen besteht, entspricht dem z_{ELISA} eine Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 1\%$. Man darf also darauf vertrauen, daß bei länger bestehender Symptomatik der ELISA häufiger positive Ergebnisse zeigen wird, als bei kürzerer Dauer (als willkürlicher Grenztag wurde zur Berechnung der 4. Tag eingesetzt), eine Tendenz, die sich vor allem bei hohen Parasitämien auswirkt.

Dieser Zusammenhang konnte beim IFAT nicht statistisch gesichert werden ($P > 5\%$)

4.2. Vergleich verschiedener Antigene im ELISA

4.2.1. Sensitivität und Spezifität des ELISA bei 13 verschiedenen Antigenen.

Tabelle 7.			Sensitivität in % für Malaria tropica		Spezifität in % f. Gesunde f. M. tert/quart	
Anti- gen	Kurz- Bez.	Zus. setzung	bei 29 paras. nachgew. Fällen	bei 30 serol. nachgew. Fällen (=IFAT-positiv)	bei 11 ge- sunden Probanden	paras. 21 nachgew. Fällen
ELISA :						
A	II	S12 Schizonten	31	23,3	91	85
B	I	S18 Schizonten	34,5	10	100	90,5
C	II	S20 Schizonten	34,5	43,3	100	90,5
D	II	M Merozoiten	41,4	40	100	95,3
E	II	K3 gemischt	52	23,3	91	76,4
F	I	M Merozoiten	55,2	40	100	90,5
G	I	S14 Schizonten	55,2	43,3	91	90,5
H	I	K2 gemischt	58,6	53,3	91	90,5
I	I	S60 Schizonten	62	53,3	100	81
J	II	S75 Schizonten	65,5	43,3	82	71,4
K	I	S40 Schizonten	65,5	46,6	91	71,4
L	I	S95 Schizonten	72,4	63,3	100	90,5
M	II	S45 Schizonten	76	63,3	91	76,4
IFAT :						
X	II	K3 gemischt	72,4	100	100	33

Tabelle 7: Antigene, nach steigender Sensitivität für Malaria tropica geordnet, im ELISA (13 Antigene) und im IFAT (1 Antigen)

Bezüglich der Spezifität für Gesunde und Malaria tertiana oder quartana, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Antigenen errechnet werden.

Deshalb wurden die Antigene nach zunehmender Sensitivität für Malaria tropica geordnet, wo die Unterschiede größer waren.

Es zeigte sich, daß die hochkonzentrierten Schizontenantigene die beste Sensitivität von allen Antigenen besaßen.

Die Merozoiten und das gemischte Antigen waren etwas weniger sensitiv. Schizontenantigen, gewonnen durch Affinitätschromatographie zeigte sehr niedrige Sensitivität.

In der zweiten Spalte von Tabelle 7 wird dokumentiert, daß viele der Patienten, die im IFAT positiv reagierten, im ELISA negativ waren.

Das Diagnostikdiagramm fasst die Ergebnisse der Spalten 1,3,4 der Tabelle 7 auf einen Blick zusammen.

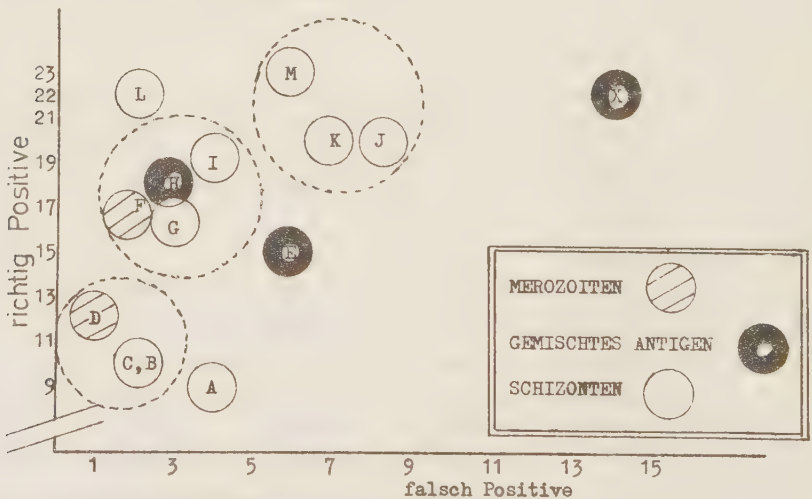


Abb. 4. Diagnostikdiagramm

Sensitivität für Malaria tropica und Spezifität für nicht-Malaria tropica (= Malaria tertiana, quartana oder gesund).

d.h. richtig positive und falsch positive absolute Häufigkeiten gegeneinander aufgetragen.

Je weiter entfernt ein Antigen von der Abszisse, desto sensitiver ist es, je näher an der Ordinate, desto spezifischer.

So sind:

J , K , M : höher sensitiv bei geringerer Spezifität

A , B , C , D : gering sensitiv bei besserer Spezifität

F , G , H , I : mittlere Sensitivität und Spezifität

L : hohe Sensitivität und Spezifität

Als Vergleich zu diesen 13 im ELISA getesteten Antigenen wurden auch die Werte des IFAT, mit dem einzigen hier verwendeten Antigen (II K3 wie E), ins Diagnostikdiagramm übernommen.:

X : Vergleichsweise hohe Sensitivität bei sehr geringer Spezifität

Sensitivität und Spezifität beziehen sich auf Gesamthäufigkeiten.

Es ist jedoch möglich, daß sich Antigene, trotz gleicher Sensitivität und Spezifität, aufgrund ihres unterschiedlichen Verteilungsmusters positiver und negativer Resultate, unterscheiden.

Diese Tatsache wurde berücksichtigt in den weiteren Vergleichen und deren statistischer Auswertung.

4.2.2. Vergleich der beiden Stämme FCB und FMCMc1 bezüglich ihrer Reagibilität* im ELISA mit verschiedenen Antigenen.

Es wurden jeweils die Antigene der beiden Stämme gegenübergestellt, deren Herstellungsmethode identisch, und deren Charakteristika somit ähnlich waren (Stadienzusammensetzung, Konzentration u.a.).

Statistische Auswertung: siehe Tabelle 8.

* Wie erwähnt (s.4.2.1.) gab es bezüglich der Spezifität, auch bei Berücksichtigung der Verteilungsmuster, keinerlei Signifikanzen.

Tabelle 8. Vergleich ähnlicher Antigene zweier Stämme von *Plasmodium falciparum* in vitro, bezüglich der Seropositiven von 59 Malariapatienten (29 paras., 30 serol. (IFAT) positiv).

Stamm	Antigen-	Irrtumswahrscheinlich-
FCB - FMCMc1	art	keit P nach Mc Nemar(18)
I S14 > II S12	Schizonten *	0,02 *
I S18 < II S20	Schizonten *	0,017 *
I S40 < II S45	Schizonten **	0,01 **
I S60 II S75	Schizonten	1
I K 2 > II K 3	gemischt *	0,015 *
I M II M	Merozoiten	0,34

* signifikant: $P \leq 0,05$

** hochsignifikant: $P \leq 0,01$

Es traten zum Teil signifikante bis hochsignifikante Unterschiede zwischen ähnlichen Antigenpräparationen der beiden Stämme auf.

4.2.3. Vergleich verschieden konzentrierter[§] Schizontenantigene

Hier erschien die Beurteilung der Reaktionsstärke sinnvoll, d.h. es wurde bei der statistischen Auswertung von der Klasseneinteilung in positiv und negativ abgegangen, und quantitativ ausgewertet. Dazu eignete sich der Rangzahltest für multiple Vergleiche nach Wilcoxon und Wilcox (18). Es wurden nur die parasitologisch positiven Malariafälle berücksichtigt. (siehe Tabelle 9.)

* Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Parasitendichte im

Tabelle 9. Differenzen aus Rangsummen bei n = 29 Seren,
getestet mit k = 5 Antigenen von Stamm FCB

FCB	S14	S60	S40	S95
S18	22	41**	50**	64**
S14		19	28	42**
S60			10	23
S40				13

Das Antigen S18 unterscheidet sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $IWP < 1\%$ von den hochkonzentrierten Antigenen S60, S40 und S95; ebenso, das Antigen S14 von S95. Andere Differenzen sind weder auf dem 1 noch auf dem 5 % Niveau bedeutsam.

Tabelle 10. Differenzen aus Rangsummen bei n = 29 Seren,
getestet mit k = 4 Antigenen von Stamm FMCMc1.

FMCMc1	S20	S75	S45
S12	2,5	34**	49**
S20		31**	47**
S75			15

Die Antigene S12 und S20 unterscheiden sich hochsignifikant ($IWP < 1\%$) von den Antigenen S75 und S45. Sonst treten keine signifikanten Differenzen auf.

Bei beiden Stämmen reagierten jeweils die hochkonzentrierten Antigene (40 bzw. 45 %) z.T. hochsignifikant sensitiver, als die schwächer konzentrierten (18 bzw. 20 %).

4.2.4. Vergleich von Antigenen aus verschiedenen Stadien

Rangzahltest nach Wilcoxon und Wilcox: Es interessierten hier nur die Differenzen, bei denen Merozoiten oder gemischtes Antigen (M bzw. K) beteiligt waren. Differenzen zwischen Schizonten - zu - Schizonten-Antigen wurden schon in 4.2.3. behandelt.

Tabelle 11. Differenzen aus Rangsummen bei n = 29 Seren, getestet mit k = 7 Antigenen von Stamm FCB.

FCB	S14	K	S60	M	S40	S95
S18	32	41	59 **	58 *	74 **	90 **
S14		9	27	34	42	58 **
K			18	25	33	49 *
S60				7	15	31
M					8	24
S40						16

S18 war hochsignifikant schwächer als Merozoitenantigen. Gemischtes Antigen K war signifikant weniger sensitiv als das höchstkonzentrierte S95. Sonst gab es außer den in 4.2.3. erwähnten keine signifikanten Differenzen.

* signifikant : $P \leq 5\%$
 ** hochsignifikant: $P \leq 1\%$ } gilt für alle statistischen Tests.

Tabelle 12. Differenzen aus Rangsummen bei n = 29 Seren,
getestet mit k = 6 Antigenen von Stamm FMCMc1.

FMCMc1	S20	M	K	S75	S45
S12	5	10	41*	57**	78**
S20		5	36	52**	73**
M			31	47*	67**
K				16	36
S75					20

Gemischtes Antigen K war signifikant sensitiver als S12.

Die beiden hochkonzentrierten Antigene S75 und S45 waren signifikant bzw. hochsignifikant sensitiver als das Merozoitenantigen M.

Bei einem Stamm(FCB) war das gemischte Antigen,beim anderen das Merozoitenantigen (FMCMc1) deutlich weniger sensitiv als hochkonzentriertes Schizontenantigen.

Beide Antigene (K und M) lagen bei beiden Stämmen jedoch besser als niedrig konzentriertes Schizontenantigen,wenn auch nicht signifikant.

4.2.5. Antigen,gewonnen durch Immunabsorption mittels CNBr-aktivierter Sepharose 6 MB.

In den Tabellen 11.und 12. wird die geringe Sensitivität der beiden chromatographisch hergestellten,niedrig konzentrierten Schizontenantigene S18 und S20 deutlich.Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zu den jeweiligen hochkonzentrierten Schizontenantigenen,sowie z.T. signifikante Differenzen zu Merozoitenantigen (FCB).

4.3. Kreuzreaktionen im ELISA zwischen Malaria tropica und verschiedenen anderen Infektionskrankheiten.

61 Patienten des Tropeninstitutes mit verschiedenen bakteriellen oder parasitären Erkrankungen der Tropen und subtropischen Gebiete, wurden mit dem sensitivsten Antigen (II S45) für Malaria tropica auf kreuzreagierende Antikörper gegen Plasmodium falciparum - Antigen getestet. In 11 Fällen gab es positive Resultate, die jedoch zum größten Teil niedrige Titer aufwiesen.

Von diesen 11 Seropositiven stammten je ein Patient aus Kenie, Tanzania, Thailand, Elfenbeinküste, Sudan und Dubai; zwei waren aus Ghana, zwei waren deutsche Touristen aus tropischen Gebieten, bei einem ließ sich die Herkunft nicht ermitteln.

Titer	ELISA (II S45 Antigen)						
1/1024	X						
1/256		X				X	
		X	X			X	positiv
1/64	X						
	X	X	X			X	
1/16	XXX		X		X	X	
X	XXX	XXX	X	X	X	X	
1/4	XX	XXX	XXX	X	X	XX	X negativ
	XX	XXX	XXXXX	XX	XXX	XX	XXX
	Toxo- plas- mose	Leish- mani- asis	Amöbi- asis	Trypa- noso- miasis	Typhus	Salmo- nello- sen	Syphi- lis

Abb.5. Kreuzreaktionen im ELISA zwischen Pl.falc.Antigen und Antikörpern aus Seren von Patienten mit aufgeführten Erkrankungen.

Von 15 Patienten mit Leishmaniose waren 3 seropositiv; ebenso 3 von 16 Patienten mit Amöbiasis, 3 von 9 Luespatienten, sowie 2 der 7 Fälle von Schlafkrankheit.

Die übrigen Seren von Patienten mit Toxoplasmose, Typhus und Salmonellenerkrankungen waren alle negativ.

Die Ergebnisse von Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Plasmodienarten sind in Kapitel 4.1.1. und 4.1.2. dokumentiert.

5. DISKUSSION

5.1. Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen

5.1.1. Antigen

Probleme der Reproduzierbarkeit stellte in erster Linie die Antigen-gewinnung.

Es gab Antigenpräparationen, die schon in Vorversuchen verworfen wurden. Entweder sie reagierten zu schwach mit positiven Referenzseren, oder zu stark mit negativen Kontrollen. Gründe dafür könnten eventuell degene-riertes Kulturmateriel aufgrund von Pilzwachstum sein, oder zu große Verunreinigung mit unspezifischem Antigen.

Einfluß auf die Reaktionen im ELISA hatte auch die unterschiedliche Proteinbindungsfähigkeit des Polystyrols der Mikrotiterplatten ver-schiedener Fabrikate. Deshalb wurden nur Platten eines Herstellers (Nunc) verwendet.

Weitere antigenbezogene Parameter, wie die Parasitenkonzentration im Ausgangsmateriel, nach Gelsedimentation und im Perkoll - Dichtegradien-ten, variierte von Probe zu Probe. Die Konzentrationsangaben selbst sind unter dem Vorbehalt zu sehen, daß sie durch visuelle mikroskopische Auswertung erhalten wurden.

Die Stadienzusammensetzung des Ausgangsmaterials variierte erheblich. Dies hätte durch Synchronisieren der Kultur verbessert werden können. Auch wäre dadurch vielleicht die Ausbeute an Antigen größer und die Trennung der Schizonten von anderen Stadien vollständiger gewesen. So kann jedoch von " reinem " Schizontenantigen nicht ausgegangen werden. Selbst das Merozoitenantigen, als reinste Fraktion, dürfte nicht ganz frei von anderen Stadien vorgelegen haben.

Zur Kontrolle der Reinheit wäre der Einsatz eines Elektronenmikroskops hilfreich gewesen.

Auch bei der Affinitätschromatographie waren verschiedene schwierig kontrollierbare Einflüsse gegeben.

So enthielt der IgG - Pool nicht nur malariaspezifische Antikörper, sondern alle möglichen anderen Antikörper, wie z.B. solche gegen Erythrozytenantigene u.a., zumal festgestellt wurde, daß selbst bei hochinfizierten Malariapatienten nur etwa 5 % des gesamten IgG's plasmodienspezifisch war (1). Demnach konnten aus dem Hämolysat nicht nur korpuskuläre Parasitenbestandteile, sondern auch anderes antigenetisch wirksames Material, wie erythrozytenassoziiertes Antigen, gebunden werden.

In welchem Ausmaß das fertige lösliche Antigen mit Erythrozytenmembranen kontaminiert war, wurde auch hier nicht festgestellt. Neben dem Elektronenmikroskop wären auch Erythrozytenantikörper als "Indikator" für erythrozytäres Antigen denkbar.

Obwohl Prior (17) beschrieb, daß nach der Ammoniumchloridhämolyse die Parasiten weitgehend frei von Erythrozytenmembranen und morphologisch intakt vorlagen, wurde bei gleichem Vorgehen mit anschließender Beschallung, an der tief dunkelroten Farbe der Proben schon mit bloßem Auge erkenntlich, daß immer noch Hämoglobin freigesetzt wurde und das Antigen somit sicher noch erheblich kontaminiert war.

Inwieweit durch die Hämolyse und Beschallungsvorgänge auch Plasmodienbestandteile zerstört wurden oder in anschließenden Isolierungsverfahren verloren gingen, konnte nicht nachvollzogen werden. Die Beschallungsdosis ergab sich zum einen aus Werten früherer Arbeiten am Institut mit Babesia, zum anderen wurde sie experimentell den Bedürfnissen der Versuche

angepaßt, indem diejenige Dosis verwendet wurde, bei der die Antigene in Vorversuchen mit Referenzseren die besten Resultate lieferten. Eine Untersuchung, von der im Rahmen dieser Arbeit abgesehen wurde, war die Durchführung des ELISA mit Antigen von *Plasmodium vivax*, ovale und *malariae*. Schon beim IFAT wurde betont, homologes Antigen zu verwenden, wenn größte Sensitivität erreicht werden soll (23,19). Jedoch ist die Antigenbeschaffung mangels Kultivierungsmöglichkeiten für diese Plasmodienarten wesentlich schwieriger.

5.1.2. Seren

Nachweislich negativ beeinflusst wurden die Titer durch mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren der Seren. Da deren Haltbarkeit in aufgetautem Zustand bei $4 - 8^{\circ} \text{C}$ jedoch nur etwa eine Woche betrug, ließ sich die genannte Prozedur nicht immer vermeiden. Da fast alle Seren zuerst im IFAT getestet wurden, könnten die Ergebnisse hinsichtlich der Sensitivität etwas zugunsten des IFAT ausgefallen sein.

Da pro Patient nur eine Serumprobe vorlag, konnten keine Aussagen bezüglich des Antikörperverlaufs gemacht werden. Das Stadium der Erkrankung ließ sich lediglich aus der Anamnese und der Klinik bestimmen.

5.1.3. Testverfahren

ELISA und IFAT wurden nur mit monovalentem Anti - IgG durchgeführt. Damit konnten möglicherweise ganz akute Fälle serologisch nicht erkannt werden, da erst nach länger bestehender Infektion aus den anfänglich IgM-produzierenden B-Lymphozyten, IgG-Produzenten werden (22).

Zur Aufdeckung der ersten Antikörper wäre Anti - IgM oder polyvalentes Antitummunglobulin möglicherweise geeigneter.

Zum Vergleich zwischen ELISA und IFAT wurde ein Antigen gewählt, das

geringe Sensitivität und Spezifität, verglichen mit einigen anderen Antigenen hatte. Es wären im IFAT durchaus noch bessere Resultate mit einem der anderen Antigene denkbar.

Aussagen bezüglich des IFAT sind, da nur eine Versuchsreihe ausgewertet wurde, vorsichtiger zu beurteilen, als solche bezüglich des ELISA mit 13 Versuchsreihen.

Während bei einigen, auf Kreuzreaktionen überprüfte, Erkrankungen größere Fallzahlen nötig gewesen wären (z.B. Lues und Schlafkrankheit), standen bei anderen interessierenden Krankheiten, wie z.B. den Babesiosen, überhaupt keine Seren zur Verfügung.

5.2. Bewertung eigener Ergebnisse und Vergleich mit anderen Untersuchungen.

Die Eignung von Plasmodienantigen für den ELISA wurde mehrfach gezeigt. Francis und Gupta (6) demonstrierten die Brauchbarkeit von Plasmodienantigen aus der Kultur, mit guter Reproduzierbarkeit.

Der ELISA wird immer häufiger auch bei Malaria, anstelle des bisher verwendeten IFAT, eingesetzt.

In jüngster Zeit wurde versucht, Tests auf der Basis des ELISA mit monoklonalen Antikörpern zu entwickeln, was zu guten Ergebnissen führte (12). So wurde z.B. ein monoklonaler Antikörper gegen ein, für Plasmodium falciparum spezifisches Enzym, die Glutamat-Dehydrogenase, gefunden. Damit konnte ein modifizierter ELISA durchgeführt werden (10).

Beim Vergleich zwischen ELISA und IFAT erhielt Gupta (7) kaum signifikante Unterschiede, lediglich höhere Titer im IFAT. Letzteres konnte hier bestätigt werden.

Ebenso zeigte Voller (30), daß die Resultate gewöhnlich parallel waren, der ELISA aber weniger effektiv in der Aufdeckung niedriger Antikörperniveaus war.

Spencer dagegen berichtete über höhere Sensitivität und Titer des ELISA, allerdings bei Verwendung verschiedener Stämme für ELISA und IFAT (20). In der jetzt vorliegenden Arbeit zeigte sich der IFAT sensitiver als der ELISA für Malaria, zum Teil auf Kosten der Spezifität für Malaria tertiana und quartana.

So gab es im IFAT häufiger positive Reaktionen mit Antikörpern gegen Plasmodium vivax, ovale und malariae. Es ist allerdings bekannt, daß ver-

schiedene Plasmodien gemeinsame Antigene besitzen (32). Es wurden sogar Kreuzreaktionen zwischen Primaten- und Humanmalaria im IFAT beobachtet (29). Seitz (19) beschreibt, daß im IFAT mit Plasmodium falciparum Antigen, ein hoher Anteil an Seren nach einer Malaria tertiana oder quartana reagiert, wobei allerdings nur mittlere Titer erreicht werden. Dies entspricht der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung (4.1.1. Seite 22). Eine bessere Differenzierung der Antikörper wäre möglich bei Verwendung von homologem Antigen (19).

Im ELISA gab es nur in wenigen Fällen schwach positive Reaktionen mit Malaria tertiana und quartana Patienten. Auch in der Literatur fanden sich nur ähnlich schwach positive Kreuzreaktionen zwischen Plasmodienarten im ELISA beschrieben. (28)

Grund für die geringere Spezifität des IFAT könnte die stärkere Kontamination des hierbei verwendeten Antigens mit unspezifischem Antigen, sei es erythrozytären oder anderen Ursprungs, sein, da kein lösliches, gereinigtes Antigen, wie im ELISA, verwendet wird. Weil so im IFAT ein größeres Antigenspektrum angeboten wird, erklärt dies vielleicht auch die vergleichsweise hohe Sensitivität des IFAT. Schon mit einfachem Kulturantigen ist der IFAT so sensitiv, wie der ELISA erst mit hochkonzentriertem Schizontenantigen.

Obwohl die Unterschiede zwischen ELISA und IFAT bezüglich der Sensitivität und Spezifität größtenteils signifikant waren, waren hochpositive Titer des einen Tests zumeist assoziiert mit positiven des anderen. Die Diskordanzfälle lagen hauptsächlich im Grenzbereich von negativen zu positiven Titerstufen.

Dabei waren es meist Seren mit schwach positiven Titern im IFAT, die negative Resultate im ELISA ergaben. Spalte 2 in Tabelle 7. (Seite 31) spiegelt

diesen Sachverhalt wider, indem von allen 30, im IFAT positiven Seren, im ELISA im besten Fall nur 63 %, im schlechtesten Fall sogar nur 10 % seropositiv waren.

Daß anhand des Titers im IFAT alleine nicht beurteilt werden konnte, ob es sich um einen niedrigen Anfangstiter einer vielleicht schon bedrohlichen Malaria tropica handelt, ob eine schwache Kreuzreaktion mit heterologen Plasmodienantikörpern vorliegt, oder ob nur der Resttiter einer (19) früheren Infektion festgestellt wurde, zeigt die Problematik in der klinischen Deutung eines Serologiebefundes. Daß auch hohe Titer, im IFAT z.B. über 1:256, sowohl eine akute Malaria, als auch völlige Gesundheit bedeuten können, wie bei Afrikanern, die aus Malariagebieten stammen und Monate bis Jahre nach einer Erkrankung an Malaria in der Regel hohe Titer aufweisen, kompliziert die Verhältnisse noch mehr (19).

So hatten möglicherweise einige der Patienten, die im IFAT positiv, im ELISA aber negativ waren, eine Malaria tertiana oder quartana, und wurden deshalb vom spezifischeren ELISA nicht als Malaria-infiziert erkannt.

Nicht signifikant waren dagegen die Unterschiede zwischen ELISA und IFAT bezüglich der Abhängigkeit ihrer Titer vom Stadium der Erkrankung und von der Höhe der Parasitämie.

Die Tendenz, mit zunehmendem Intervall zwischen Symptombeginn und dem Zeitpunkt der Serumabnahme, sowie mit zunehmender Parasitendichte im Austrich, höhere Titer zu zeigen, war deshalb beim ELISA ausgeprägter als beim IFAT, weil bei Letzterem, besonders bei kürzer bestehender Symptomatik schon häufiger positive Resultate erzielt wurden; aber auch bei geringeren Parasitämien waren die Titer im IFAT im Durchschnitt höher als im ELISA. D.h., daß der IFAT sich sensitiver im Aufdecken niedriger bzw. früher Antikörperspiegels zeigte. Diese Beobachtung deckt sich mit der, von Voller (28) gemach-

ten.

Der relativ große Anteil an negativen Resultaten in beiden Tests bei frischen Infektionen spricht allerdings dafür, daß hier noch keine Antikörper des IgG-Typs gebildet wurden (zumindest nicht in meßbarer Menge). Bei älteren Infektionen war dagegen der überwiegende Teil der Patienten seropositiv. Die einzigen zwei negativen Resultate von 9 Patienten mit länger als 10 Tage zurückliegendem Beginn von ersten Symptomen ließen sich damit erklären, daß beide in der Zwischenzeit unregelmäßig Antimalariamedikamente eingenommen hatten; in beiden Fällen waren Parasiten nur noch ganz spärlich im Ausstrich nachweisbar.

Patienten mit geringer Parasitendichte im Blut waren entweder ganz frisch infiziert, oder, wie zuvor beschrieben, unbehandelte ältere Infektionen. Seropositiv waren im ELISA nur die letzteren, während im IFAT auch die frisch infizierten Fälle mit niedriger Parasitämie in 3 von 13 Fällen positiv reagierten. Dies ist ebenfalls ein Hinweis auf die höhere Sensitivität des IFAT für frühe Antikörper.

Ein Vergleich bezüglich technisch-praktischer Aspekte zeigt den ELISA als den etwas langwierigeren Test. Dies hauptsächlich deswegen, weil beim ELISA die Vorwegnahme von vorbereitenden Arbeitsschritten schwieriger als beim IFAT ist. D.h., nach der Antigenbeschichtung gestaltet sich der Feuchtigkeitsabschluß bei den kleinen IFAT-Objektträgern sehr einfach, nicht dagegen bei den relativ großen Mikrotiterplatten des ELISA. Damit ist die Möglichkeit, antigenbeschichtete Platten zu konservieren, eingeschränkt. Vorteil des ELISA ist jedoch die Möglichkeit der Auswertung großer Patientenzahlen auf einmal und dies sogar mit bloßem Auge.

Die Untersuchungen antigenbezogener Einflußgrößen auf die Reaktionen im ELISA ergaben Folgendes:

Ein hochpositiver Titer (d.h. über 1:256) mit einem der 13 Antigene war häufig assoziiert mit positiven Titern bei anderen Antigenen. Über 60 % der tropica und über 95 % der tertiana und quartana Patienten reagierten mit mehr als 10 Antigenen übereinstimmend positiv oder negativ.

Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen vergleichbaren Antigenpräparationen der beiden Stämme FCB und FMCMc1 bezüglich der Sensitivität des ELISA bei bestimmten Patientengruppen. Da jedoch im Endresultat die erzielten Positivraten bei gleichen Antigenpräparationen relativ ähnlich waren, konnte keine Aussage gemacht werden, welcher Stamm besser geeignet für den ELISA sei. Zweimal reagierte Antigen vom Stamm FCB etwas stärker, zweimal war es Antigen vom Stamm FMCMc1 das höhere Sensitivität zeigte.

Die übrigen zwei Antigenpräparationen zeigten keine Unterschiede.

Auch von Tharavanij (26) wurde bei Untersuchungen verschiedener Stämme auf ihre Eignung in IFAT, ELISA und IHA, besonders unterschiedliches Verhalten einzelner Stämme im ELISA beobachtet.

Die verschieden konzentrierten Schizontenantigene konnten in zwei Klassen eingeteilt werden, die sich bezüglich ihrer Sensitivität zum Teil hochsignifikant unterschieden. Eine Klasse mit niedrigen Konzentrationen (bis zu ca. 20 % Parasitämie) und eine, mit höheren Parasitämien (ab ca. 40 %), von denen Letztere deutlich bessere Resultate ergab. Innerhalb der Klassen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die Versuche mit Immunabsorption verliefen allesamt enttäuschend.

Ziel der Affinitätschromatographie war es, die Kontamination des Antigens zu verringern und es gleichzeitig zu konzentrieren, um dadurch höhere Spezi-

fität und Sensitivität zu erreichen. Die Überlegung dabei war, durch den Serumpool ein möglichst großes Antigenspektrum abzudecken. Diese Antikörper sollten korpuskuläres Parasitenantigen aus dem Hämolysat binden. Das nichtgebundene Erythrozytenmaterial konnte entfernt werden. Zum Herauswaschen des Parasitenantigens wurde lösliches gemischtes Kulturantigen im überschuß zugegeben, welches um die Bindungsstellen in der Chromatographiesäule konkurrieren sollte. Der Anteil löslichen Antigens, der mit ins Eluat gelangte, konnte durch Zentrifugieren leicht von dem korpuskulären Antigen getrennt werden. Obwohl sicher auch Erythrozytenmembrane in der Säule gebunden und wieder herausgewaschen wurden, zeigte die anschließende Beschallung bei nur schwachroter Verfärbung einen geringeren Gehalt an Hämoglobin und damit geringere Kontamination an, als z.B. nach der chemischen Hämolyse mit Ammoniumchlorid.

Tatsächlich wurde mit so hergestelltem Antigen sehr hohe Spezifität erreicht, jedoch nur geringe Sensitivität. Möglicherweise wurden durch die Passage in der Chromatographiesäule Antigenkomponenten zurückgehalten oder zerstört. Auch die erreichten Parasitenkonzentrationen bei der Elution waren sehr niedrig.

Berücksichtigt man den höheren Zeitaufwand und Materialverbrauch, so bietet dieses Verfahren keine Vorteile gegenüber den anderen Isolationsmethoden. Die Frage nach Unterschieden zwischen den verschiedenen Stadien asexueller Blutformen entstand aus Berichten über deren unterschiedliche Antigenkomponenten. Deans(4) identifizierte 11 Hauptantigene bei Plasmodium knowlesi. 9 waren Ringen, Trophozoiten, Schizonten und Merozoiten gemeinsam, eines war spezifisch für Trophozoiten, eines für Schizonten und Merozoiten(9). Es konnte gezeigt werden, daß auch bei anderen Plasmodienarten Antigenkomponenten

während der gesamten Entwicklung der Blutformen auftreten, einige Komponenten jedoch nur in reifen Formen (13).

Targett (24) verglich die Antigenität von Plasmodium falciparum-Trophozoiten mit derjenigen, von Schizonten und erreichte mit Schizonten bessere Resultate.

Deshalb wurden in dieser Arbeit den Schizontenantigenen die Merozoitenantigene gegenübergestellt. Außerdem wurde gemischtes Kulturantigen, das alle Stadien enthielt, mitgetestet.

Wieder stellte sich das hochkonzentrierte Schizontenantigen als das sensitivste Antigen heraus.

Signifikant schwächer war das Merozoitenantigen nur vom Stamm FMCMc1 und das gemischte Antigen vom Stamm FCB.

Sollten die Merozoiten tatsächlich ein, den Schizonten ähnliches Antigenpektrum besitzen (9), so überrascht die dafür geringe Sensitivität. Möglicherweise liegt es daran, daß eine Kontamination mit unspezifischem Antigen bei den Merozoiten weitgehend reduziert ist. Auch, an Erythrozyten gebundenes, plasmodien-assoziiertes Antigen dürfte so gut wie nicht enthalten sein. Hinweis für die Reinheit und Konzentriertheit des Antigens könnten die niedrigen Konzentrationsoptima trotz relativ geringem Proteingehalts des Merozoitenantigens sein (siehe Tabelle 1. Seite 15).

Das Fehlen dieser zusätzlichen Antigene, die ihren Teil zum gesamten Antigenpektrum beitragen, könnte auch die hohe Spezifität des Merozoitenantigens erklären, wie auch diejenige, des hochgereinigten Schizontenantigens I S95.

Unterschiede zwischen Merozoiten - und gemischtem Antigen waren gering. Beim Stamm FCB war das Merozoitenantigen sensitiver, beim Stamm FMCMc1 war es das gemischte Antigen.

Die Untersuchungen auf Kreuzreaktionen mit " Nicht-Malaria Patienten " ergaben keinen Anhalt für konstant kreuzreagierende Antikörper.

Die wenigen positiven Reaktionen könnten auch auf eine frühere Malariaerkrankung zurückzuführen sein, die nicht so unwahrscheinlich wäre, da 10 der 11 positiven Patienten in Ländern waren, bzw. von dorthier stammen, in denen Malaria vorkommt.

5.3. Schlußfolgerungen

1. Der Ifat mit Plasmodium falciparum-Kulturantigen erwies sich als sensibler zum Nachweis von malariaspezifischen IgG-Antikörpern als der ELISA mit gleichem Antigen. Besonders wirkt sich dies aus zu Beginn akuter Erkrankungen und bei niedrigen Antikörperniveaus.
2. Der IFAT zeigte eine geringere Spezifität als der ELISA. D.h. bei Verwendung von Plasmodium falciparum Antigen werden auch vivax, ovale und malariae-Plasmodien- Antikörper erkannt. Der IFAT erwies sich als geeigneter zur Aufdeckung akuter und zurückliegender Malariaerkrankungen, der ELISA besser zur gezielten spezifischen Artdiagnose.
3. Mit Erythrozytenmembranen kontaminiertes Antigen, wie das im IFAT verwendete, zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Sensitivität verglichen mit gereinigtem Antigen, jedoch eine geringere Spezifität.
4. IFAT -und ELISA - Titer korrelierten bei akuten Erkrankungen mäßig positiv mit ansteigender Parasitenkonzentration im Blut des Patienten, sowie mit zunehmender Dauer der Erkrankung, solange noch keine Behandlung begonnen wurde.
5. Bei akuten Malariaerkrankungen waren Antikörper innerhalb der ersten 5 Krankheitstage im IFAT bei 50 % und im ELISA bei 27 % der Patienten nachweisbar. Der Antikörpernachweis ist daher zur Diagnose akuter Erkrankungen nur von geringer Bedeutung. Das Fehlen von Antikörpern schließt eine Malaria vor allem zu Beginn der Erkrankung keineswegs aus.
6. Verschiedene Plasmodium falciparum-Kulturstämme reagierten im ELISA unterschiedlich.

7. Die Antigenität (d.h. die Sensitivität) von gereinigtem Schizonten-antigen war besser, wenn das Antigen stark konzentriert war.
8. Je gereinigter das Antigen von Kultur-/Wirtsmaterial, vor allem von Erythrozytenbestandteilen war, desto höher war seine Spezifität im ELISA. Dabei ergab sich jedoch eine Verminderung der Sensitivität, wie sich beim hochspezifischen aber wenig sensitiven Merozoitenantigen zeigte.
9. Die Verwendung von Antigen, das mittels hochtitrigen Patientenserum affinitätschromatographisch gereinigt wurde, zeigte zwar eine höhere Spezifität im ELISA als fast alle anderen Antigenpräparationen (außer einer Merozoitenpräparation), besaß jedoch die niedrigste Sensitivität.
10. Hochkonzentriertes Schizontenantigen war deutlich sensibler im ELISA als gemischtes - und Merozoitenantigen.

Niedrigkonzentriertes Schizontenantigen zeigte allerdings geringere Sensitivität im Vergleich zu gemischtem Antigen und Merozoitenantigen. Wählt man folglich Schizontenantigen für Untersuchungen, so sollte man möglichst hohe Konzentrationen erreichen ($> 50\%$), um dessen Vorteil gegenüber gemischtem Antigen ausnützen zu können. Die Reinheit des Antigens spielt dabei keine Rolle. Erst bei starker Kontamination wird die Sensitivität negativ beeinflusst, sonst scheint die Kontamination mit Wirtszellbestandteilen als Träger plasmodienassoziiertem Antigen eher zur Steigerung der Sensitivität beizutragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten die Unterschiede verschiedener Plasmodium falciparum-Kulturstämme und der Einfluß der Antigenpräparation beim Nachweis spezifischer Antikörper überprüft werden. Hierzu wurden 13 unterschiedliche Antigenpräparationen von zwei verschiedenen Pl.falc. Stämmen mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)-und IFAT (indirect fluorescent antibody test) - Technik zum Nachweis von Antikörpern an 175 Seren von Patienten mit Malaria tropica, tertiana und quartana, sowie anderen Erkrankungen einschließlich einer Kontrollgruppe gesunder Personen, untersucht. Es ergaben sich Unterschiede in der Antigenität zwischen beiden Stämmen, wie auch zwischen Antigenen verschiedener Stadien und Parasitenkonzentrationen des Kulturmaterials.

Am sensitivsten war hochkonzentriertes Schizontenantigen, am spezifischsten waren das Merozoitenantigen und das durch Immunabsorption gewonnene Schizontenantigen.

Die Ergebnisse mit letzterem zeigten sich jedoch aufgrund besonders schwacher Sensitivität unbefriedigend.

ELISA und IFAT zeigten vielfach Übereinstimmung, der IFAT war im Durchschnitt sensitiver aber weniger spezifisch als der ELISA. Beide Tests korrelierten im beobachteten Zeitintervall mäßig positiv mit der Parasitendichte im Blut der Patienten und der Dauer bestehender Symptome.

Der Beginn der Antikörperbildung bei akuten Erkrankungen wurde mittels IFAT meist früher erfasst als mittels ELISA.

Innerhalb der ersten 5 Krankheitstage waren jedoch nur bei 50 % (IFAT) bzw. 27 % (ELISA) der Patienten Antikörper nachweisbar.

7. ANHANG

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Cohen, S.; Butcher, G.; Crandall, R.:
Action of malarial antibody in vitro.
Nature 223 (1969), p 368
- (2) Cohen, S.; Butcher, G.:
Serum antibody in aquired malarial immunity.
Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 65 No. 2 (1971), pp 125-134
- (3) Cohen, S.; Lambert, G.:
Malaria.
Churchill Livingstone , New York (1982) , pp 423-465
- (4) Deans, J.; Dennis, E.; Cohen, S.:
Antigenic analysis of sequential erythrocytic stages of plas-
modium knowlesi
Parasitology 77 (1978), pp 333-334
- (5) Engvall, E.; Perlmann, P.:
Enzyme linked immunosorbent assay.Quantitative assay of
immunoglobulin G.
Immunochemistry, 8 (1971), pp 871-874
- (6) Francis, V.; Gupta, M.; Bhat, P.:
Evaluation of a crude soluble antigene from in vitro culture
of plasmodium falciparum for ELISA.
Tropenmed.Paras. 33 (1982), pp 240-242

- (7) Gupta, M.; Sebastian, M.; Bhat, P.; Lobel, H.:
Evaluation of in vitro cultured plasmodium falciparum as
antigene for malaria serology.
J.Trop.Med.Hyg. 84 (1981), pp 165-170
- (8) Cravely, S.; Kreier, J.:
Adoptiv transfer of immunity to plasmodium berghei with
immune T and B lymphocytes.
Infect.Immun. 14 pp 184-190
- (9) Heidrich, H.; Mrema, J.; Vander Jagt, D.; Reyes, P.;
Rieckmann, K.:
Isolation of intracellular parasites (pl.falc.) from culture,
using free flow electrophoresis: Separation of the free para-
sites according to the stages.
J.Paras. 68 (1982), pp 443-450
- (10) Hempelmann, E.:
Monoklonale Antikörper: Mit neuem Malariatest künftig schnel-
lere Diagnose?
Ärztezeitung Ausgabe vom 28. Juli 1986 p 11
- (11) Jensen, J.:
Concentration from continuous culture of erythrocytes, infec-
ted with trophozoites and schizonts of plasmodium falciparum.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 27 (1977), pp 1274-1276

- (12) Kagan, J.:
Progress in the diagnosis of parasitic diseases.
Mitteilung auf dem IX.Internationalen Kongress über Infektions- und Parasitenkrankheiten; München 1986
- (13) Kilejean, A.:
Stage specific proteins and glycoproteins of plasmodium falciparum; identification of antigens unique to schizonts and merozoites.
Proc.Nat.Acad.Sci. 77 (1980), pp 3695
- (14) Kreier, J.; Green, T.:
Immune response to plasmodia.
Malaria, Vol. 3 : Immunology and immunization;
Academic Press, New York (1980)
- (15) Lang, W.:
Impfstoffe gegen Parasiten.
Münch.Med.Wschr. 123 Nr. 1 (1981) pp 21-22
- (16) Lange,
Biomathematik für Mediziner.
Vorlesungsorientiertes Scriptum TU München (1984)
- (17) Prior, R.; Smucker, R.; Kreier, J.; Pfister, R.:
A comparison by electronmicroscopy of plasmodium berghei freed by ammonium chloride lysis to plasmodium berghei freed by ultrasound in a continuous flow system.
J.Paras. 59 (1973), pp 200-201

- (18) Sachs, L.:
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag
- (19) Seitz, H.:
Antikörpernachweis bei Malariaverdacht: Wert und Grenzen.
Deutsches Ärzteblatt Bd. 36 Ausgabe C (9/1986), p 2361
- (20) Spencer, H.; Collins, W.; Skinner, J.:
The enzyme linked immunosorbent assay for malaria. Comparison
with the malaria indirect fluorescent antibody test (IFA).
Am.J.Trop.Med.Hyg. 128 (1979), pp 933-936
- (21) Steinbuch, M.; Audran, R.:
The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of
caprylic acid.
Archivs of Biochemistry and Biophysics 134 (1969), pp 279-284
- (22) Sterzl, J.; Nordin, A.:
The common cell precursor for cells producing different immuno-
globulins.
Cell interactions and receptor antibodies in immune response.
(Mäkela, O.) Academic Press, New York (1971), pp 213-230
- (23) Sulzer, A.; Wilson, M.; Turner, A.; Kagan, I.:
A multispezies malaria antigen for use in the indirect fluo-
rescent antibody test.
Trans.Rey.Soc.Trop.Med.Hyg. 67 No.1 (1973), pp 55-58

- (24) Targett, G.:
Antibody response to plasmodium falciparum malaria. Comparison of immunoglobulin concentrations, antibody titers and the antigenicity of different asexual forms of the parasites.
Clin.exp.Immunol. 7 (1970), pp 501-517
- (25) Tharavanij, S.; Prasertsiriroy, V.
Simultaneous preparation of merozoites and schizonts of plasmodium falciparum.
Southeast Asian J.Trop.Med.Pub.Hlth. 12 (1981), pp 518-524
- (26) Tharavanij, S.; Tantivanisch, S.; Chonsa Nguang, M.; Prasertsiriroy, V.:
Comparison of various serological test results using antigens from different strains of plasmodium falciparum.
Southeast Asian J.Trop.Med.Pub.Hlth. 13 No.2 (1982) pp 174-180
- (27) Trager, W.; Jensen, J.:
Cultivation of erythrocytic and exoerythrocytic stages of plasmodia.
Malaria Vol. 2 Academic Press (1980), pp 271-319
- (28) Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D.:
Enzyme immunoassays for parasitic diseases.
Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 70 No.2 (1976),

- (29) Voller, A.:
Fluorescent antibody studies on malaria parasites.
Bull. WHO 27 (1962), pp 283-287
- (30) Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D.:
Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques.
J.Clin.Path. 31 (1978), pp 507-520
- (31) Voller, A.; Meuwissen, J.; Verhave, J.
Immunoassays in malaria.
Malaria, Vol. 3 Immunology and immunization
Academic Press, New York (1980) pp 67-109
- (32) Zuckermann, A.; Spira, P.:
Immunoelectrophoretic comparison of plasmodial antigens.
WHO Malar.Doc. 449 (1965), pp 65-70

LEBENS LAUF

Ich, Folke Ingmar Hess, wurde am 7.1.1960 als Sohn des Arztes Dr. Siegfried Hess und seiner Frau Gisela, geb. Lenz, in Donau-
eschingen geboren.

Von 1966 - 1970 besuchte ich die Volksschule, anschließend das Mathematisch- naturwissenschaftliche Gregor Mendel Gymnasium in Amberg, wo ich 1979 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1979 - 1981 studierte ich an der Universität Regensburg Humanmedizin. Nach der ärztlichen Vorprüfung wechselte ich an die technische Universität in München und erhielt hier, nach Bestehen der ärztlichen Prüfung im Oktober 1985, die Approbation als Arzt.

Seit Juni 1982 beschäftige ich mich am Institut für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München mit der Dissertation.

Seit Dezember 1985 leiste ich meine Wehrpflicht als Stabsarzt bei der Bundeswehr ab.

Seit Februar 1984 bin ich mit Zainab Hess, geb. Louca, verheiratet.

Im gleichen Jahr kam unsere Tochter Jasmin zur Welt.

